Untersuchungen über Nebensterine der Hefe

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Philosophischen Fakultät (Sektion II)

der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt im Oktober 1935

von

Hermann Schreiber

aus Hamburg.

1939

Druckerei und Verlag wissenschaftlicher Werke Konrad Triltsch
Würzburg-Aumühle

Berichterstatter: Geheimrat Professor Dr. H. Wieland.
Tag der mündlichen Prüfung: 11. Dezember 1935.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Vorliegende Arbeit wurde im Chemischen Laboratorium des Staates zu München ausgeführt.

An dieser Stelle möchte ich meinem hochverehrten Lehrer,

Herrn Geheimrat Professor Dr. H. Wieland,

der mir die Anregung zu dieser Arbeit gab, für seine wertvollen Ratschläge und die mir jederzeit gewährte Hilfe bei der Ausführung meinen ergebensten Dank aussprechen.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554006_0170

Die Körperklasse der Sterine ist in der belebten Natur weit verbreitet und von grundlegender Bedeutung. Sie besteht aus den im Tierreich vorkommenden Zoosterinen und den pflanzlichen Sterinen mit dem Namen Phytosterine. Es ist bemerkenswert, daß noch kein Beispiel dafür bekannt ist, daß ein tierisches Sterin im Pflanzenreich aufgefunden worden wäre oder umgekehrt.

Die Sterine finden sich als ständige Begleiter der tierischen und pflanzlichen Fette und Öle teils frei, teils mit diesen verestert. Von den Zoosterinen ist das wichtigste das Cholesterin, das auch den Hauptbestandteil der Gallensteine bildet; ferner das in den Fäces vorkommende Koprosterin.

Das bekannteste und meistuntersuchte pflanzliche Sterin, das Ergosterin, ist das Hauptsterin der Hefe und wird aus dem Hefefett außer Zymosterin und einer Reihe von Nebensterinen bei der Verseifung erhalten. Das Ergosterin wurde zuerst aus Mutterkorn isoliert. Das Sitosterin ist in den Fetten höherer Pflanzen neben geringen Mengen anderer Sterine enthalten, während das dem Ergosterin nah verwandte Stigmasterin vorwiegend in der Mohrrübe und in der Sojabohne vorkommt.

Die Sterine sind gut kristallisierende Körper, für die die von Windaus entdeckte Fällbarkeit mit Digitonin in alkoholischer Lösung charakteristisch ist. Diese Fällbarkeit ist durch die allen Sterinen gemeinsame alkoholische Hydroxylgruppe bedingt. Einige künstliche Sterine machen eine Ausnahme, da die Digitonidbildung von einer bestimmten sterischen Anordnung der OH-Gruppe abhängig ist. Mit Essigsäureanhydrid und konzentrierter Schwefelsäure (Liebermann-Burchard'sche Reaktion) oder mit Chloroform und Schwefelsäure geben die Sterine charakteristische Farbreaktionen.

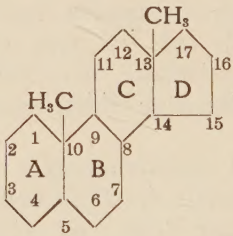
Nahe verwandt mit den Sterinen sind die in der Gallenflüssigkeit vorkommenden Gallensäuren, deren komplizierte Konstitution in umfassenden Arbeiten von Wieland[1]) aufgeklärt wurde. Die Ergebnisse auf diesem Gebiet waren von großer Bedeutung auch für die

[1]) H. Wieland, Ztschr. anorg. Chem. 42, 421 (1929). Zusammenfassung. B. 67, A, 27 (1934).

Klasse der Sterine, deren Beziehung zu den Gallensäuren schon lange vermutet wurde, bis es 1919 Windaus gelang, das Vorhandensein eines gemeinsamen Grundgerüstes experimentell zu beweisen, indem er vom Cholesterin ausgehend, durch oxydativen Abbau eines Teils der Seitenkette zu der bekannten Allocholansäure gelangte.

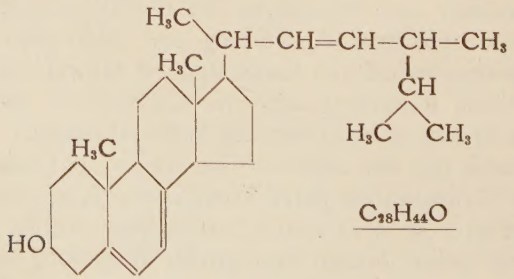
Andererseits haben die Forschungsergebnisse in der Reihe der Sterine, die vornehmlich Windaus zu verdanken sind, viele wertvolle Beiträge zur Konstitutionsfrage der Gallensäure geliefert.

Nach den im wesentlichen als abgeschlossen zu betrachtenden Arbeiten über den Aufbau der Sterine und Gallensäuren kommt diesen das gemeinsame Grundgerüst des perhydrierten Naphtindens mit den Ringen A, B, C und D und den in C_{10} und C_{13} stehenden Methylgruppen zu.



Bei Zugrundelegung dieses gemeinsamen Gerüstes unterscheiden sich nun die Sterine und Gallensäuren durch die Zahl und Lage der Doppelbindungen und Hydroxylgruppen und durch die Form und Länge der in C_{17} angreifenden Seitenkette.

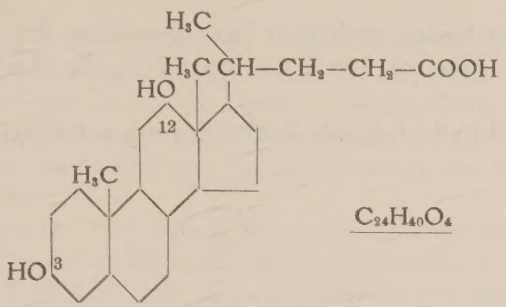
So hat z. B. das Ergosterin nach Chuang[2]), der es auf die bekannte Nor-Allocholansäure zurückführte, die nachfolgende Formel, nachdem in einer neueren Arbeit von Windaus[3]) auch die Stellung der OH-Gruppe und die Lage der drei Doppelbindungen festgelegt wurden:



$C_{28}H_{44}O$

[2]) Chuang, Ann. 500, 270 (1933).
[3]) Windaus, Ann. 510, 248 (1934).

Die Gallensäuren sind in der Regel in der Seitenkette um vier Kohlenstoffatome ärmer. Als Beispiel sei die Desoxycholsäure, eine 3,12-Dioxycholsäure, angeführt:



$C_{24}H_{40}O_4$

Das Ergosterin hat stark an Bedeutung gewonnen durch seinen Übergang in das antirachitische Vitamin D bei der Bestrahlung mit ultraviolettem Licht. Windaus hatte schon 1931 das Vitamin D_2 kristallisiert in Händen, jedoch ist seine Konstitution noch nicht endgültig festgelegt. Wahrscheinlich ist der Ring B unter Verlagerung der Doppelbindungen zwischen C_9 und C_{10} geöffnet.

In seinem Aufbau vollständig erkannt ist auch das Stigmasterin[4]), $C_{29}H_{48}O$, das sich vom Ergosterin dadurch unterscheidet, daß es eine Doppelbindung weniger im Ring B und eine Methylgruppe mehr in der Seitenkette hat[5]).

Das in der Haifischgalle als Schwefelsäureester vorkommende Scymnol $C_{27}H_{46}O_5$ stellt eine interessante Zwischenstufe des biologischen Abbaus vom Cholesterin zu den Gallensäuren dar. Es hat drei sekundäre und eine primäre alkoholische Hydroxylgruppe und ein in Form eines Äthylenoxydringes gebundenes Sauerstoffatom in der Seitenkette.

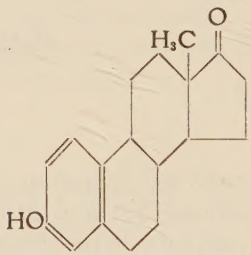
Die besondere Bedeutung der Gallensäuren im Organismus liegt darin, daß sie als Natriumsalze mit den Fettsäuren wasserlösliche Molekülverbindungen bilden und so die Resorption der Fettsäuren im Darm ermöglichen. Nachdem die Fettsäuren auf diese Weise an ihren Bestimmungsort gelangt sind, werden sie abgespalten und die Gallensäuren wieder ihrem Zwecke zugeführt. Ebenso wichtig sind die Gallensäuren auch für die Resorption der Provitamine A und die Regulierung der Wasserstoffionenkonzentration bei der Verdauung.

[4]) Windaus, B. 65, 1006 (1932).
[5]) Fernholz, Ann. 507, 128 (1933).

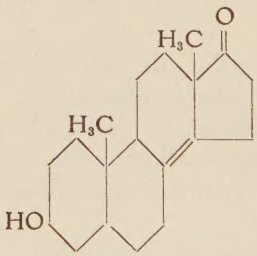
Wie allgemein die Bedeutung der Sterine und Gallensäuren ist, geht auch daraus hervor, daß nahe Beziehungen zu den Sexualhormonen, den Krötengiften und den Herzgiften der Digitalisglukoside bestehen.

Das eine der beiden weiblichen Sexualhormone, das Follikelhormon, hat nach Arbeiten von Butenandt[6]) das Ringgefüge der Sterine.

Butenandt gibt folgende Formel für das α-Follikelhormon an:



Während in dieser Formel schon die Methylgruppe in C_{10} fehlt und der Ring A aromatisch ist, steht das männliche Sexualhormon, das sogenannte Testikelhormon, auch Androsteron genannt, den Sterinen noch näher. Beide Methylgruppen und die alicyclische Struktur sind noch erhalten:



Das zweite weibliche Sexualhormon, das Corpus-luteum-Hormon, läßt sich nach neueren Angaben ohne Schwierigkeiten aus Stigmasterin darstellen.

Auch bei den Hautdrüsensekreten der Kröten, die schon lange als Herzgifte bekannt sind, ist es erwiesen, daß die Genine das Sterolgerüst besitzen. Die gleiche Feststellung wurde auch für die Herzgifte der Digitalis- und Strophantusarten gemacht.

[6]) Ber. 66, 601 (1933).

Bei dem jetzigen Einblick in die Chemie der Gallensäuren und Sterine ist es von großem Interesse, neue Sterine oder sterinähnliche Körper aufzufinden, die das Bild vervollständigen und vor allem dazu beitragen sollen, Übergangsstufen des biologischen Auf- und Abbaus zu erkennen.

In dieser Arbeit ist nun die Untersuchung der Mutterlaugen, die bei der Ergosteringewinnung anfallen, fortgesetzt worden. Diese Rückstände stammen von sehr großen, industriell verarbeiteten Posten Hefe und bieten so die Möglichkeit, zu Stoffen zu gelangen, die in der Hefe im Verhältnis zum Ergosterin nur in verschwindend kleiner Menge enthalten sind.

Die Zelle der Hefe scheint sich in der Bildung von Sterinen durch eine ganz besondere Mannigfaltigkeit auszuzeichnen.

Aus den Mutterlaugen des aus Preßhefe gewonnenen Ergosterins wurden in den letzten Jahren eine Reihe neuer Sterine isoliert [7]). Zuerst das dem Ergosterin wahrscheinlich isomere Neosterin, das Fäcosterin und das ähnliche Ascosterin, ferner das schon von Ida Smedley-Maclean entdeckte Zymosterin [8]). Später wurden aus ähnlichen Rückständen noch 4 weitere Sterine [9]) isoliert, denen wohl allen der tetracyclische Kohlenwasserstoff $C_{27}H_{48}$ zugrunde liegt.

Die Löslichkeitsverhältnisse dieser Sterine und auch ihrer Derivate sind untereinander sehr ähnlich, auch kristallisieren sie gern in isomorphen Mischkristallen, so daß ihre Trennung und Reindarstellung außerordentlich mühevoll und zeitraubend ist und zudem in den meisten Fällen nur minimale Ausbeuten liefert. Dazu kommt noch, daß durch die Verschiedenheit der zur Verfügung stehenden Fraktionen von Mutterlaugen das Nacharbeiten einer angegebenen Methode zur Isolierung oder eines beschriebenen Trennungsganges so gut wie ausgeschlossen ist.

Als Ausgangsmaterial wurden für diese Arbeit verwendet:

1. Ein fast weißes Kristallgemisch aus Äther-Alkohol mit dem unscharfen Schmelzpunkt 90°—110°.
2. Ein schon mehrere Jahre altes Steringemisch, das aus Äther kristallisiert war. Dieses Gemisch war schon stark gelb gefärbt und schmolz unscharf bei 110° unter Schäumen, Sintern von 80° an.

Das erstgenannte Steringemisch wurde in Pyridin benzoyliert und die Benzoylverbindung der fraktionierten Kristallisation unterworfen.

---

7) H. Wieland u. Asano, A. 473, 300 (1929).
8) Biochem. Journ. 22, 22 (1928).
9) H. Wieland u. Gouch, A. 482, 36 (1930); H. Wieland u. Stanley, A. 489, 31 (1931).

Wie der niedrige Schmelzpunkt des freien Sterins schon vermuten ließ, zeigte sich, daß der Hauptbestandteil Zymosterinbenzoat war, das in guter Ausbeute rein erhalten werden konnte.

Als weiterer Bestandteil wurde ein Sterinbenzoat gefunden, das in dünnen klaren, meist rechteckigen Blättchen aus Aceton und Essigester kristallisierte, und dessen Schmelzpunkt bei 131° konstant blieb. Da der Schmelzpunkt scharf war, wurde angenommen, daß es sich um das bereits 1929 isolierte Ascosterin handele. Schmelzpunkt, Kristallform und Löslichkeitsverhältnisse waren die gleichen; auch die optische Drehung stimmte innerhalb der Fehlergrenze mit der des Ascosterins überein.

Als nun das Benzoat verseift wurde, erhielt man beim Umkristallisieren aus Alkohol zuerst eine in Blättchen kristallisierende Fraktion, die einen um 3° höheren Schmelzpunkt hatte, als er für das Ascosterin mit 141—142° angegeben ist. Durch mehrfaches Umkristallisieren aus verschiedenen Lösungsmitteln wurde der Schmelzpunkt auf 148°—151° gebracht, konnte aber nicht mehr erhöht oder schärfer erhalten werden. Die Hauptmenge des verseiften Sterins, die aus der Alkoholmutterlauge kristallisiert in Blättchen erhalten wurde, hatte auch nach nochmaligem Umkristallisieren aus Alkohol den scharfen Schmelzpunkt des Ascosterins. Wahrscheinlich handelt es sich bei dem höher schmelzenden Sterin um ein Gemisch mit Fäcosterin, von dem das Ascosterin nicht vollständig abgetrennt werden konnte. Auch die Ergebnisse der optischen Drehung lassen diese Annahme gerechtfertigt erscheinen: Die spezifische Drehung des bei 148°—151° schmelzenden Sterins liegt zwischen der der beiden genannten Sterine.

Eine quantitative Auswertung der spezifischen Drehung konnte wegen der durch zu kleine Mengen bedingten größeren Fehler und der nah beieinander liegenden Drehwerte beider Sterine nicht durchgeführt werden.

Mehrfaches Umkristallisieren des Benzoylsterins 131° aus Äthylmethylketon brachte einen etwas unschärferen, aber höheren Schmelzpunkt, 136°—137°, was mit den Angaben über ein Gemisch der beiden Sterinbenzoate[10]) übereinstimmt.

Das unter 2. angeführte Ausgangsmaterial hatte ursprünglich aus kristallisierten Nebensterinen bestanden, was auch noch an seiner äußeren Struktur zu erkennen war. Wie die im experimentellen Teil beschriebenen Untersuchungen zeigen, hatte sich die Natur dieses Materials wesentlich verändert (es war einige Jahre hindurch in einer Pulverflasche aufbewahrt worden). Das Material zeigte nicht mehr

[10]) H. Wieland u. Asano, A. 473, 309 (1929).

die geringste Neigung zur Kristallisation und enthielt erhebliche Mengen saurer Bestandteile. Da diese wahrscheinlich durch Autoxydation aus Sterinen hervorgegangen waren, war es interessant, sie zu isolieren und zu untersuchen, ebenso das, was daneben an neutralen Stoffen vorhanden war.

Eine Verseifung mit einer gemessenen Menge methylalkoholischer Kalilauge, bei der ein bestimmter Prozentsatz vor und nach der Verseifung zur Titration entnommen wurde, zeigte, daß ungefähr ein Viertel der vorhandenen Säuren esterartig gebunden war. Der Alkaliverbrauch war so, daß bei einem Äquivalentgewicht von 350—400, wie es z. B. den Gallensäuren zukommt, über die Hälfte des Materials saurer Natur hätte sein müssen. Die Aufarbeitung zeigte aber, daß ungefähr $^1/_6$ bis $^1/_{10}$ Säuren waren. Es mußten also auch niedrigere oder mehrbasische Säuren vorhanden sein.

Der in Äther unlösliche Teil des Ausgangsmaterials, ein gelbes Pulver, wurde nicht näher untersucht. Der lösliche Teil, ungefähr die Hälfte, wurde durch Ausschütteln mit Sodalösung und Natronlauge in neutrale und saure Bestandteile getrennt. Dabei fiel auf, daß eine vollständige Trennung nicht ganz einfach war, weil von den Natriumsalzen der Säuren beim Ausschütteln aus Äther hartnäckig Neutralsubstanz festgehalten wurde. Trotzdem die Trennung mehrmals wiederholt wurde, blieben im Äther nach dem Schütteln mit Sodalösung immer wieder kleine Mengen neutraler Substanz.

Die aus den Na-Salzen erhaltene freie Säure, eine braungelbe amorphe Masse, konnte mit Äther und Essigester weiter gereinigt, aber nicht kristallisiert werden. Sie erschien unterm Mikroskop als farblose, durchscheinende, runde Körner. Mit Essigsäureanhydrid und konz. Schwefelsäure gab sie deutliche Farbreaktion. Das Kaliumsalz kristallisierte nicht. Es löste sich in Wasser trübe und schleimig auf. Trotz vieler Versuche konnte die freie Säure nicht zur Kristallisation gebracht werden. Eine Titration ergab ein Äquivalentgewicht von 790. Diese hohe Zahl weist darauf hin, daß noch Verunreinigungen neutraler und hochmolekularer Natur vorliegen.

Der Versuch einer Umsetzung mit Diazomethan ergab trotz lebhafter Reaktion keinen kristallisierten Methylester; auch eine Hochvakuumdestillation desselben brachte keinen Fortschritt.

Aus der Ätherlösung, aus der die sauren Bestandteile entfernt worden waren, wurden ca. 2 g einer weißen amorphen Abscheidung gewonnen, die auch eine Farkreaktion gab, aber weder vor noch nach der Verseifung eine kristallisierte oder definierte Substanz lieferte.

Aus der Äthermutterlauge, einem zähen Sirup, wurde auch nichts Kristallisiertes erhalten. Nach der Verseifung dieser Mutterlauge konnte 1,5 g kristallisierter Sterine isoliert werden, die um 110° unscharf schmolzen. Aus diesem Gemisch konnte aber auch nach der Benzoylierung kein einheitliches Sterin gewonnen werden. Wieder verseift schmolz das Steringemisch zwischen 122° und 127°. Daraus ließ sich durch Schwerlöslichkeit in Azeton ein Sterin abtrennen, das scharf bei 147°—148° schmolz und diesen Schmelzpunkt beim Umkristallisieren beibehielt. Da die Ausbeute nur 20 mg betrug, wurde kein Benzoylderivat mehr dargestellt. Die Analysenzahlen des in Spießen aus Methanol kristallisierenden Sterins stimmen auf die Zusammensetzung $C_{23}H_{38}O \cdot 1/2\ H_2O$ oder $C_{31}H_{52}O_2$, die also von der der übrigen Hefesterine ziemlich stark abweicht. Leider konnte die Einheitlichkeit wegen der geringen Menge nicht völlig sichergestellt werden. Das Sterin ist in kaltem Alkohol und Methanol ziemlich schwer löslich.

Aus den bei der Verseifung der einzelnen neutralen Teile anfallenden braunen Rückständen von Alkalisalzen konnten keine Säuren isoliert werden.

Um die im Ausgangsmaterial vorhandenen freien Säuren, die mit Sodalösung aus Äther ausgefällt werden, in einem höheren Grad von Reinheit zu erhalten, wurde neues Material nach verbesserter Methode aufgearbeitet. Dabei wurden durch Reinigung über die Na-Salze farblose, in Äther und den Alkoholen gut lösliche Säuren erhalten, die aber nicht kristallisierten. Sie geben mit Essigsäurenanhydrid und Schwefelsäure eine kräftige Farbreaktion und verhalten sich gegen Brom in Eisessig und gegen Permanganat ungesättigt. Das Na-Salz kristallisiert aus heißem Alkohol schlecht und nur unter dem Mikroskop erkennbar in undeutlichen farblosen Büscheln. Es löst sich in Wasser zu einer schleimigen trüben Lösung.

Der Methylester der Säuren zeichnet sich dagegen durch große Kristallisationsfähigkeit aus. Es scheint aber ein Gemisch von Säuren bezw. Methylestern von sehr ähnlichen Lösungs- und Kristallisationseigenschaften vorzuliegen, denn durch keinerlei Kristallisationsmethoden, weder mit den Salzen noch mit den Estern, gelang es, ein einheitliches Präparat mit scharfem Schmelzpunkt zu isolieren. Die Methylester kristallisieren aus Äther und den Alkoholen stets in dünnen, durchsichtigen Blättchen; die mehr oder weniger unscharfen Schmelzpunkte bewegen sich zwischen 100° und 145°. Sie sind leicht löslich in Äther, Alkohol, Essigester, Benzol, Chloroform, Eisessig, schwer löslich in Petroläther.

Eine gewisse Trennung in höher und niedriger schmelzende Ester war nach der Methode der chromatographischen Adsorption möglich, wobei Aluminiumoxyd als Absorptionsmittel und Benzol als Lösungsmittel verwendet wurde. Bei Vorhandensein größerer Mengen der fraglichen Substanz würde nach dieser Methode wohl eine Trennung und Reindarstellung möglich sein.

Die Analyse eines Methylesters, der zwischen 90° und 105° schmolz, ergab einen Sauerstoffgehalt von ca. 13%. Die Analysenzahlen stimmen auf die Zusammensetzung $C_{23}H_{36}O_3$ oder $C_{24}H_{38}O_3$.

Die Analyse eines zwischen 120° und 145° schmelzenden Esters stimmte am besten auf die Summenformel $C_{25}H_{40}O_3$.

Die kristallisierten Ester sind ungesättigt, nach ihrer deutlichen Gelbfärbung mit Tetranittromethan zu schließen. Auch gegen Brom in Eisessig verhalten sie sich ungesättigt. Sie ließen sich jedoch nicht katalytisch hydrieren. Ihre Farbreaktion mit Essigsäureanhydrid und Schwefelsäure ist sehr kräftig: zuerst rot, dann über blau langsam nach grün.

Mit Hilfe einer noch besseren Reinigung der Na-Salze durch Kristallisation aus 95%igem Pyridin wurde schließlich eine kristallisierte Säure erhalten, die in Methanol sehr leicht löslich ist und daraus in Büscheln von spitzen Blättchen kristallisiert. Sie ist aber auch nicht einheitlich, wie aus dem großen Schmelzbereich von 160°—185° hervorgeht.

Ihre Analyse entspricht am genauesten der Summenformel $C_{22}H_{36}O_3$, es ist aber auch eine Formel mit 23 oder 24 C-Atomen möglich. Die Säure scheint nicht sehr beständig zu sein, da sie sich beim Schmelzen allmählich braun färbt. Bei der Titration ergab sich ein Äquivalentgewicht von rund 400.

Der aus dieser Säure dargestellte Methylester kristallisierte wieder in großen dünnen Blättchen und schmolz zwischen 110° und 120°. Es war auch jetzt nicht möglich, daraus einen scharf schmelzenden Ester zu isolieren.

Das Vorkommen in den Hefesterinmutterlaugen, die kräftige, für Sterine charakteristische Farbreaktion, die Analysenergebnisse und das ungefähre Äquivalentgewicht lassen die hier bearbeiteten Säuren den Gallensäuren nahe verwandt erscheinen. In vielen Ergosterinmutterlaugen finden sich neben den freien Säuren auch Ester solcher Säuren mit Sterinen, was sich auch in der quantitativen Verfolgung der Verseifung des hier untersuchten Materials äußert.

Es erhebt sich nun die Frage nach der Herkunft und der Entstehung dieser Säuren. Man muß annehmen, daß die Säuren entweder

bereits in der Hefezelle gebildet worden sind, oder daß sie beim Altern aus gewissen Vorstufen durch Autoxydation entstanden sind. Bei den bisher bekannten Hefesterinen wurden noch keine derartigen Beobachtungen gemacht. Es müßten also in diesem Falle in den Ergosterinmutterlaugen ein oder mehrere Körper noch unbekannter Natur enthalten sein, die an der Luft zu Säuren oxydiert werden. Das Aussehen des gealterten Materials, seine Unkristallisierbarkeit, die veränderte Löslichkeit gegenüber der ursprünglichen und auch das quantitative Verhalten des teilweise verharzten Materials gegen Alkali machen es wahrscheinlich, daß hier eine starke Zersetzung unter Oxydation vor sich gegangen ist. Es läßt sich aber nicht mit Sicherheit behaupten, daß die hier untersuchten sterinähnlichen Säuren bei dieser Zersetzung entstanden sind.

Man hat auch viele Jahre alte Nebensterinmutterlaugen untersucht, in denen gar keine Säuren enthalten waren. In diesen Fällen waren die Sterine allerdings auch fast ganz unzersetzt geblieben.

Es soll noch erwähnt werden, daß sich die Anwesenheit von Estern schlecht mit der Annahme vereinbaren läßt, daß die Säuren aus Sterinen oder ähnlichen Körpern durch Autoxydation entstanden sind. Auch die Abwesenheit von Wasser bei dem in trockener Luft aufbewahrten Steringemisch verträgt sich nicht gut mit der Annahme einer Autoxydation.

Damit würde die erstere Annahme, daß nämlich die Säuren als solche von der Hefezelle und — wie es scheint — mit ähnlicher Mannigfaltigkeit wie die Sterine, aufgebaut werden und zum Teil mit Sterinen verestert in der Hefe vorkommen, gestützt.

Weitere Untersuchungen von f r i s c h e m Ausgangsmaterial müssen entscheiden, ob nun das Eine oder das Andere zutrifft.

Bei ihrer Stellung zwischen den Sterinen und Gallensäuren dürften diese Säuren auch biologisch von Bedeutung sein, und es ist sicher möglich, bei Vorhandensein größerer Mengen an Ausgangsmaterial, die Säuren chemisch einheitlich zu isolieren und dann auch ihren Aufbau zu ermitteln.

Experimenteller Teil.

1. Aufarbeitung des Steringemisches aus Äther-Alkohol vom F. P. 90°—110°.

Das ziemlich frische, fast weiße Kristallgemisch wird zur Reinigung zunächst aus Essigester umkristallisiert, wobei ca. 80% der angesetzten Menge in farblosen Platten, vom Schmelzpunkt 95°—105° unter leichtem Schäumen erhalten werden.

Das Steringemisch ist leicht löslich in Äther, Alkohol, Methanol, Azeton und Essigester. Es wird versucht, das Gemisch in verschiedenen Lösungsmitteln fraktioniert zu kristallisieren, wobei jedoch keine Trennung zu erzielen ist.

20 g des Steringemisches werden nach Asano[1]) benzoyliert, zuerst mit Wasser, dann mit Alkohol gewaschen, im Exsiccator getrocknet und aus Azeton umkristallisiert. Zuerst kristallisieren feine Schuppen in Büscheln aus und nach mehrstündigem Stehen haben sich daneben noch harte, derbe bis sandige Kristalle, die die Hauptmenge darstellen, abgeschieden. Von diesen werden die Schuppen durch Aufschlämmen und Abgießen getrennt und die beiden Teile für sich behandelt.

Die Hauptmenge, aus den schweren Kristallen bestehend, wird mehrere Male aus Azeton umkristallisiert, aus dem sie in ziemlich großen, klaren Prismen herauskommt. Das Sterinbenzoat schmilzt bei 127°—128° zu einer trüben Schmelze, die bei 138° klar ist. Es handelt sich demnach um das Zymosterin, das zweithäufigste Sterin der Hefezelle.

Der in Schuppen kristallisierte Anteil, der bei 114°—118° unscharf schmilzt, wird wechselweise mehrere Male aus Azeton und Essigester umkristallisiert. Dabei werden 0,2 g große, glänzende, rechteckige dünne Blättchen erhalten, deren Schmelzpunkt bei 130° bis 131° scharf ist und konstant bleibt. Diese Daten stimmen mit denen des von Asano[2]) isolierten Ascosterins überein.

---

[1]) H. Wieland und Asano, A. 473, 300 (1929).
[2]) H. Wieland und Asano, A. 473, 300 (1929).

Um eine größere Menge davon zu erhalten und um zu versuchen, etwa noch vorhandene andere Sterine zu isolieren, wurden nochmals 130 g des, wie oben beschrieben, vorgereinigten Steringemisches in Pyridin benzoyliert.

Die so erhaltenen 150 g Benzoylsterin wurden in 800 ccm Essigester heiß gelöst und die Lösung langsam abkühlen gelassen. Nach dem Absaugen und Trocknen erhielt man rund 70 g Kristalle vom Schmelzpunkt 117°—122°. Auch äußerlich wiesen die Eigenschaften der Kristallisation auf das schon vorher isolierte Zymosterinbenzoat hin. Die weitere Reinigung durch Umkristallisieren aus Aceton ergab, daß es sich auch hier um fast reines Zymosterin handelte. Die Mutterlaugen wurden nun jeweils auf die Hälfte eingeengt, der Kristallisation überlassen und so im Ganzen 5 Fraktionen erhalten, die alle zum großen Teil aus Zymosterin bestanden. Dieses wurde in der schon beschriebenen Weise von den anders kristallisierenden Sterinen abgetrennt, und jedes vom Zymosterin getrennte Kristallisat der einzelnen Fraktionen für sich weiter umkristallisiert.

Da diese Anteile jedoch äußerlich und auch im Schmelzpunkt, der sich zuerst zwischen 110° und 130° bewegte, alle auf das gleiche Produkt hinauskamen, große glänzende Blättchen, die zwischen 123° und 127° schmolzen, wurden sie vereinigt und lieferten nach dreimaligem Umkristallisieren aus Essigester und Aceton das bei 130° bis 131° schmelzende Sterinbenzoat in einer Ausbeute von 2 g.

Aus den Mutterlaugen der Vorreinigung der schuppigen Kristallisationen kamen noch kleine Mengen Zymosterinbenzoat heraus, und auch aus keiner der übrigen anfallenden Mutterlaugen konnte etwas Neuartiges isoliert werden.

Verseifung des Ascosterinbenzoats.

1,1 g vom Benzoylsterin 130°—131° wurden in 40 ccm 3-%iger alkoholischer Kalilauge gekocht, worauf nach einer halben Stunde alles in Lösung gegangen war. Das Reaktionsgemisch wurde in Wasser gegossen, abgesaugt, getrocknet und aus Alkohol umkristallisiert.

Die erste Fraktion, die in einer Menge von 0,2 g auskristallisierte, zeigte den Schmelzpunkt von 143°—146°, also einen höheren, als den des freien Ascosterins. Die Hauptmenge jedoch, die nach dem Einengen ebenfalls in klaren Blättchen herauskam, hatte den für das Ascosterin angegebenen scharfen Schmelzpunkt 141°—142°, der auch bei nochmaligem Umkristallisieren konstant blieb.

Das Sterin 143°—146° wurde noch zweimal aus Alkohol umkristallisiert, wobei sein Schmelzpunkt auf 148°—151° stieg, aber mit keinem der angewandten Lösungsmittel zu erhöhen war.

Da der unscharfe Schmelzpunkt auf ein Gemisch hinwies, wurde versucht, das Sterin mit Hilfe der Digitoninfällung nach Windaus zu reinigen. Der Versuch führte jedoch zu keinem Ergebnis.

Da es wahrscheinlich ist, daß das Ascosterinbenzoat mit wenig des isomeren Fäcosterinbenzoats verunreinigt ist, wurde das restliche Benzoat vom Schmelzpunkt 130°—131° einigemale aus Methyläthylketon umkristallisiert, wodurch der Schmelzpunkt auf 136°—137° gesteigert wurde, die Substanz jedoch auf wenige Milligramm zusammengeschrumpft war.

Spezifische Drehung des Ascosterinbenzoats.

0,069 g Substanz wurden in 2 ccm Chloroform gelöst und die optische Drehung in einem 1 dm-Rohr bei 20° bestimmt. Als Durchschnitt mehrerer Ablesungen ergab sich der Winkel + 1,25°.

$$[a]_D^{20} = \frac{2 \cdot 1{,}25}{0{,}069} = +36{,}2°$$

Spezifische Drehung des Sterins 148°—151°.

0,0709 g in 2 ccm Chloroform gelöst, 1 dm-Rohr, abgelesener Winkel bei 20° + 1,44°.

$$[a]_D^{20} = \frac{2 \cdot 1{,}44}{0{,}0709} = +40{,}6°$$

0,0317 g in 2 ccm Chloroform gelöst, 1 dm-Rohr, abgelesener Winkel bei 24° + 0,68°.

$$[a]_D^{24} = \frac{2 \cdot 0{,}71}{0{,}0317} = +44{,}8°$$

Spezifische Drehung im Durchschnitt + 42,7°.

Zum Vergleich seien die von Asano gefundenen Werte der spezifischen Drehung und der Schmelzpunkte des Ascosterins und Fäcosterins angeführt:

			Benzoat	
	$[a]_D$	Schmp.	$[a]_D$	Schmp.
Ascosterin	45°	141—142°	37°	130—131°
Fäcosterin	42,1°	161—163°	34,7°	144—146°

2. Aufarbeitung des gealterten gelben Steringemisches aus Äthermutterlaugen.

Das schon mehrere Jahre alte, stark gelb gefärbte Steringemisch, das ursprünglich aus Äther kristallisiert war, gab mit Äther zuerst eine zähe Schmiere, die mit mehr Äther allmählich zu einem gelben Pulver verrieben werden konnte. Das Pulver war in Äther unlöslich, und der im Äther gelöste Teil kristallisierte nicht mehr aus diesem Lösungsmittel. Auch mit anderen Lösungsmitteln war keine Kristallisation zu erzielen. Da das Material zudem beträchtliche Mengen saurer Bestandteile enthielt, mußte angenommen werden, daß es sich durchAutoxydation stark verändert hatte.

Um seine Zusammensetzung bezüglich saurer, neutraler und esterartiger Bestandteile zu untersuchen, wurde mit alkoholischem Ätzkali folgende Verseifung und Säurebestimmung vorgenommen:

3 g Ausgangsmaterial wurden in Methanol gelöst, mit 5 ccm 4-n.methylalkoholischer Kalilauge versetzt und mit Methanol auf 100 ccm aufgefüllt. Dann wurden 5 ccm abpipettiert und nach dem Verdünnen mit Methanol mit n/10 Salzsäure gegen Phenolphtalein titriert. Der Rest wurde am Rückfluß gekocht und alle halbe Stunde eine Probe von 5 ccm entnommen und titriert.

1. sofort titriert	8,05 ccm	n/10 HCl
2. nach ½stünd. Verseifung	7,50 ccm	„
3.	7,40 ccm	„
4.	7,35 ccm	„
5.	7,30 ccm	„
6.	7,25 ccm	„
7.	7,30 ccm	„

Der 20. Teil der verwendeten Lauge, das sind also 5 ccm, entspricht 10,30 ccm n/10 HCl. Also wurden zur Neutralisation vor der Verseifung 10,30 — 8,05 = 2,25 ccm n/10 KOH und für die Verseifung 0,75 ccm n/10 KOH verbraucht. Die Zeit bis zur vollständigen Verseifung betrug 2 Stunden. Die Menge der freien Säuren zu der der gebundenen verhält sich also ungefähr wie 3:1.

Legt man den Säuren ein Molekulargewicht von der Größenordnung der Sterine und Gallensäuren zugrunde, so müßte über die Hälfte des Materials saurer Natur sein.

50 g des Ausgangsmaterials wurden mit 500 ccm trockenem Äther, nach dem Abgießen desselben nochmals mit 250 ccm Äther durchgeschüttelt und verrieben und dann abgesaugt. Die Substanz war un-

gefähr zur Hälfte im Äther gelöst. Der aus einem gelben Pulver bestehende Rest war in Äther praktisch unlöslich. Die gelbe Ätherlösung wurde mit n/1 Sodalösung geschüttelt, diese abgelassen und neue Sodalösung zugesetzt, bis sie nach dem Schütteln klar blieb, dann mit 5/n NaOH bis zur Entfernung aller Säuren durchgeschüttelt und die Ätherlösung mit Wasser nachgewaschen. Die Natriumsalze enthaltende Sodalösung wurde mit Salzsäure kongosauer gemacht und die ausgefällten Säuren durch längeres Schütteln wieder in Äther aufgenommen. Daraus wurden sie erneut mit n/1 Sodalösung gefällt, die Salze abgetrennt und wieder angesäuert. Das zuerst flockige weiche gelbbraun gefärbte Säuregemisch ließ sich nach dem Stehen über Nacht zerbröckeln und absaugen. Nach dem Trocknen im Exsiccator betrug die Ausbeute rund 8 g. Dieses Produkt wurde mit wenig Äther verrieben und dieser abgesaugt, wodurch ein großer Teil der Braunfärbung entfernt wurde; dann wurde das Pulver in Essigester heiß gelöst, von Verunreinigungen abfiltriert und langsam erkalten lassen. Die Säuren schieden sich daraus als ziemlich helles amorphes Pulver ab, das unterm Mikroskop als sandige durchsichtige Körner erscheint. Ausbeute rund 3 g.

Liebermann-Burchard'sche Farbreaktion: einige mg des Pulvers werden in 1 ccm Essigsäureanhydrid gelöst und dann mit 1 Tropfen konz. Schwefelsäure versetzt. Die Lösung färbt sich zuerst rot, dann rasch violett, langsam blau und geht dann allmählich in grün über.

Ein Teil der gereinigten Säuren wurde in Methanol gelöst, mit methylalkoholischer Kalilauge gegen Phenolphtalein neutralisiert und etwas eingedampft. Das Kaliumsalz schied sich zwar als Pulver aus, war aber nicht zur Kristallisation zu bringen. Es wurde abgesaugt und in Wasser aufgenommen. Mit diesem bildete es eine kolloidale trübe Lösung, aus der beim Ansäuern die Säuren weiß, flockig und amorph ausfielen. Die Fällung wurde wieder abgesaugt und getrocknet. Die Säuren kristallisierten aber in diesem Zustand mit keinem Lösungsmittel. Die Farbreaktion war dieselbe. Das Pulver schmilzt sehr unscharf zwischen 130° und 180°.

Als weiterer Versuch zur Reinigung wurde 1 g der aus Essigester ausgeschiedenen fast weißen Säure in Alkohol gelöst und darauf mit dem dreifachen Volumen Äther versetzt. Bei allmählicher tropfenweiser Zugabe von Wasser, Durchschütteln in einem Tropftrichter und anschließendem Stehenlassen schied sich die Substanz weiß, aber amorph wieder aus. Auch aus der Äthermutterlauge konnte kein reineres Produkt erhalten werden.

Titration dieser Säuren: 0,116 g der aus Essigesterlösung gewonnenen Säuren wurden in Alkohol gelöst und mit n/10 NaOH gegen Phenolphtalein titriert. Verbrauch 1,50 ccm.

$$\text{Äquivalentgewicht} = \frac{0{,}116 \cdot 10000}{1{,}5 \cdot 0{,}0982} = 789$$

Vergleicht man dieses Äquivalentgewicht mit dem Molekulargewicht der Sterinkörper, das ungefähr die Hälfte ausmacht, so muß man annehmen, daß den Säuren noch erhebliche Verunreinigungen neutraler oder hochmolekularer Natur anhaften.

Umsetzung der Säuren mit Diazomethan.

Als Versuch zur weiteren Reinigung wurden die Säuren in den Methylester übergeführt. 0,5 g der fast weißen Säuren wurden in überschüssige ätherische Diazomethanlösung gebracht. Es fand eine Umsetzung statt, indem sich das Säurepulver unter kräftiger Stickstoffentwicklung auflöste. Beim langsamen Eindunsten kam das Umsatzprodukt wieder amorph heraus, auch mit Methanol und anderen Lösungsmitteln war keine einwandfreie Kristallisation zu erzielen. Schmelzpunkt 90°—100° unter Schäumen. Die Farbreaktion nach Liebermann-Burchard war nicht so gut wie bei den freien Säuren; zuerst gelbrot, dann rasch rot nach schmutzig violett, langsam grau.

Hochvakuumdestillation des Methylesters: Der gewonnene Methylester wurde bei 0,2 mm Quecksilber destilliert. Bei 250°—270° ging ein gelbes Öl über, das beim Abkühlen zähflüssig wurde, aber nicht erstarrte. Mit Äther verschmierte es, ebenso mit anderen Lösungsmitteln und kristallisierte auch beim Stehen nicht. Der Rückstand der Destillation bestand nur aus Spuren.

Aufarbeitung des neutralen Teiles:

Die Ätherlösung, aus der die sauren Bestandteile des Ausgangsmaterials entfernt worden waren, wurde auf ein Viertel ihres Volumens eingedampft. Nach längerem Stehen hatte sich an den Wänden und am Boden eine dünne Schicht weißer, ziemlich fester Substanz abgeschieden. Der Äther wurde abgegossen und schied nach weiterem Einengen nochmals eine kleine Menge weißer Substanz ab, die, zum Teil in kleinen Warzen, an der Gefäßwand haftete. Beide Abscheidungen, mit Äther gewaschen, schmolzen zwischen 100° und 145° und gaben mit Essigsäureanhydrid und konzentrierter Schwefelsäure eine Farbreaktion. Sie wurden vereinigt mit Äther aus der Hülse

extrahiert. Auch durch Wiederholen dieser Operation und Umlösen mit anderen Lösungsmitteln konnte kein scharfer Schmelzpunkt und keine Kristallisation erzielt werden.

Um festzustellen, ob Ester darin enthalten seien, wurde 1 g der Substanz mit 2 ccm 4-n.alkoholischer Kalilauge in 50 ccm Methanol 2 Stunden am Rückfluß gekocht. Eine vor und eine nach der Verseifung entnommene Probe von 5 ccm wurde mit n/10 HCl titriert.

Verbrauch vor der Verseifung	7,95 ccm n/10 HCl
Verbrauch nach der Verseifung	7,55 ccm n/10 HCl

Bei der Verseifung wurden also 4 ccm n/10 KOH gebunden. Das würde bei einem Säureäquivalentgewicht von 350 0,14 g Säuren in 1 g Substanz entsprechen.

Nun wurden die restlichen 5 g der neutralen Substanz in 100 ccm n/5 methylalkoholischer Kalilauge ebenfalls 2 Stunden gekocht und das Verseifungsgemisch mit dem vorhergehenden Probeansatz zusammen im Vakuum vom Alkohol befreit. Der Rückstand wurde solange mit Äther verrieben und geschüttelt, bis nichts mehr aufgenommen wurde. Die Ätherlösung wurde eingedampft und schied wieder eine ähnliche weiße Substanz ab wie die eingesetzte. Trotz vieler Versuche war aber kein kristallisierter oder einheitlicher Körper daraus zu erhalten.

Dann wurde die Äthermutterlauge der weißen Abscheidung, eine dickflüssige braungelbe Lösung, vom Äther befreit und in der gleichen Weise verarbeitet. Sie enthielt rund 20 g neutraler Substanz. Zur Orientierung wurde wieder eine Probe von 1 g in 20 ccm 0,4-n.-methylalkoholischer Kalilauge durch 2-stündiges Kochen verseift und je eine Probe von 5 ccm vor und nach der Verseifung zur Titration entnommen.

Vor der Verseifung	20,45 ccm n/10 HCl
Nach der Verseifung	19,10 ccm n/10 HCl
	1,35 ccm n/10 HCl

Gesamtverbrauch an Alkali 4 · 1,35 ccm n/10 KOH. Dies würde ungefähr 0,2 g sterinähnlicher Säuren in 1 g entsprechen.

Anschließend wurde die dickharzige Gesamtmenge unter den gleichen Bedingungen verseift und der Alkohol im Vakuum abgedampft. Nach vollständigem Trocknen und Verreiben wurde die Masse mit Äther aus der Hülse extrahiert. Aus dem Ätherextrakt schied sich wieder eine kleine Menge (0,4 g) weißer amorpher Substanz, die bei 200°—215° schmolz, mit positiver Farbreaktion nach Liebermann-

Burchard: violett, dann blau, langsam nach grün. Die Substanz konnte ebenfalls nicht zur Kristallisation gebracht werden, auch der Schmelzpunkt blieb unscharf.

Nach dem weiteren Einengen der Ätherlösung schied sich nichts mehr daraus ab. Die sirupartige braungelbe Lösung wurde nun mit Äther auf 100 ccm verdünnt und mit 1 Liter niedrigsiedendem Petroläther 30—50° verrührt, wobei der größte Teil der gelösten Substanz als klebrige Masse ausgefällt wurde. Die fast farblose Äther-Petrolätherlösung ergab nach mehrfachem Einengen schließlich auch nur einen Sirup, der aber, mit Methanol versetzt, zu kristallisieren begann.

Nach dem Umkristallisieren aus Methanol wurden 1,5 g, in dünnen Blättchen kristallisierendes Sterin vom Schmelzpunkt 110°—112° erhalten. Es wurde zur Reinigung nochmals aus Methanol umkristallisiert und dann, wie schon beschrieben, in Pyridin benzoyliert. Das Benzoat wurde aus Aceton umkristallisiert und hatte den Schmelzpunkt 139° bis 141°. Die Schmelze war jedoch erst bei 151° klar.

Der Versuch, das Gemisch durch fraktionierte Kristallisation zu trennen, blieb bei den kleinen Mengen ohne Erfolg. Die unscharfen und verschieden hohen Schmelzpunkte der einzelnen Kristallisationen ließen auf ein Gemisch schließen, das schwer zu trennen war. Das Benzoat wurde durch 20 Minuten langes Kochen in 3-%iger methylalkoholischer Kalilauge verseift. Der Schmelzpunkt lag jetzt zwischen 122° und 127°.

Das freie Sterin hatte die Eigenschaft, daß es sich auch in viel Aceton nur zum Teil löste. Der unlösliche Teil wurde aus Methanol, in dem das Sterin auch ziemlich schwer löslich ist, zweimal umkristallisiert. Es kam beim langsamen Abkühlen in Spießen heraus und hatte den scharfen und konstanten Schmelzpunkt 147°—148°. Ausbeute 0,02 g. Die Analysenzahlen stimmen auf die Summenformeln $C_{31}H_{52}O_2$ oder $C_{23}H_{30}O \cdot 1/2\,H_2O$. Das Sterin wurde bei 85° im Vakuum über Phosphorpentoxyd getrocknet. Eine Einwage von 4,389 mg Substanz ergab bei der Verbrennung 13,12 mg CO_2 und 4,48 mg H_2O.

Gefunden:	C 81,53	H 11,42%
Berechnet für $C_{31}H_{52}O_2$:	81,58	11,43%
„ für $C_{23}H_{38}O \cdot 1/2\,H_2O$:	81,42	11,50%

Das Benzoylderivat konnte wegen der geringen Ausbeute nicht mehr dargestellt werden.

Der in Aceton lösliche Teil der freien Sterine war ein unscharf schmelzendes Gemisch, aus dem kein einheitliches Sterin mehr isoliert werden konnte.

Säuren der verseiften Äthermutterlauge: Die Salze der bei der Verseifung der 20 g neutralen Rückstandes frei gewordenen Säuren bildeten mit Wasser eine fast klare braune Lösung. Mit Salzsäure fielen die Säuren braungelb und zuerst schmierig aus, wurden aber nach einigem Stehen hart, so daß sie abgesaugt und getrocknet werden konnten. Sie verschmierten aber mit allen Lösungsmitteln, in denen sie überhaupt löslich waren.

Um eine Reinigung zu erreichen, wurden die Säuren in Methanol gelöst und mit alkoholischer Kalilauge neutralisiert. Auch bei weitgehendem Eindampfen und Stehenlassen schied sich nichts aus.

Nun wurde die Lösung stufenweise mit Äther versetzt, wobei zuerst ein dunkler schmieriger Anteil ausgefällt wurde, dann allmählich hellere. Aber auch aus den einzelnen Fraktionen konnte kein reineres Produkt erhalten werden.

Aufarbeitung weiteren Ausgangsmaterials auf Säuren.

Um zu einem besseren Produkt zu gelangen, wurden nochmals 100 g des gelben Ausgangsmaterials mit etwas abgeänderter Methode auf Säuren verarbeitet.

Das Material wurde wieder mit viel Äther geschüttelt und verrieben, bis die anfangs zähe Masse pulverig geworden war. Dann wurde der Äther abgesaugt und mit n/1 Sodalösung geschüttelt. Nachdem sich die braungelbe Sodalösung mit den flockigen Salzen abgesetzt hatte, wurde sie abgelassen und der Äther mit neuer Sodalösung geschüttelt, bis sich nichts mehr ausscheiden ließ. Die wäßrige Lösung mit den Salzen wurde nun mehrfach mit frischem Äther geschüttelt, um anhaftende neutrale Substanz zu entfernen. Da sich gezeigt hatte, daß danach den Salzen immer noch neutrale Bestandteile nicht salzartiger Natur anhafteten, wurden sie mit Äther überschichtet, angesäuert und die Säuren durch längeres Schütteln wieder in Äther aufgenommen. Dann wurde erneut mit Sodalösung geschüttelt, wobei ein nicht unbeträchtlicher Teil, der sich mit weiterer Sodalösung nicht mehr ausschütteln ließ, im Äther blieb.

Die Salze, welche in der braunen Sodalösung, die noch wasserlösliche Salze enthielt, in helleren Flocken suspendiert waren, wurden

zentrifugiert, da die Suspension sich nicht filtrieren ließ. Nach zehn Minuten Zentrifugierens hatten sich die Salze so dicht abgesetzt, daß die braune Lösung vollständig abgegossen werden konnte. Die Natriumsalze bildeten nun eine hellgelbe, dickschleimige Masse, die mit Wasser verdünnt eine trübe dickflüssige Emulsion gab. Beim Ansäuern derselben schieden sich die Säuren als fast weiße große plastische Flocken aus, die durch längeres Schütteln in 1 Liter Äther aufgenommen wurden. Der Äther wurde getrocknet und auf 250 ccm eingedampft, worauf nach einigem Stehen eine fast weiße amorphe Abscheidung an den Gefäßwänden erschien. Nach nochmaligem weiteren Einengen auf 100 ccm kam eine ähnliche Abscheidung heraus. In der Mutterlauge befand sich nun noch die Hauptmenge der gewonnenen Säuren.

Reinigung der in Äther leicht löslichen Säuren.

Die zuletzt erhaltene grünlichgelbe Ätherlösung, die die in Äther gut löslichen Säuren enthielt, wurde mit Äther auf 150 ccm verdünnt. Dann wurde unter Schütteln tropfenweise 2-n.Natronlauge zugegeben, bis sich nichts mehr ausschied. Die Natriumsalze bildeten gelbweiße Flocken, die fest an den Wandungen des Kolbens hafteten. Der Äther wurde abgegossen, mit Äther nachgespült und die Natriumsalze dann mit absolutem Alkohol verrieben. Durch scharfes Absaugen von dem nun braungelb gefärbten Alkohol ließ sich ein rein weißes Pulver gewinnen. Diese Natriumsalze konnten in heißem Alkohol gelöst werden und kamen beim langsamen Abkühlen in undeutlichen mikrokristallinen Nadeln bis Blättchen heraus. Nochmaliges Umkristallisieren brachte keine bessere Kristallisation. Die Mutterlaugen dieser Präparate lieferten nach dem Einengen nochmals kleine Mengen derselben Salze, und die Endmutterlaugen stellten einen nicht mehr kristallisierenden, fast farblosen Sirup dar.

Die weißen Natriumsalze gaben mit Essigsäureanhydrid und Schwefelsäure eine Farbreaktion: rot, rasch über violett nach blau, allmählich grün. Gegen Brom in Eisessig und gegen Permanganat verhalten sich die Natriumsalze ungesättigt. Mit Wasser bilden sie eine kolloidale trübe Lösung.

200 mg dieser Natriumsalze wurden in Wasser aufgenommen, mit HCl angesäuert und die weißen Flocken in Äther geschüttelt. Nach dem Trocknen und teilweisen Abdampfen des Äthers schieden sich die freien Säuren amorph aus. Auch aus Methylalkohol, in dem die Säuren sehr leicht löslich sind, konnte keine deutliche Kristallisation er-

halten werden. Andere Lösungsmittel eigneten sich noch schlechter. Da so mit einer Reinigung schlecht weiterzukommen war, wurde ein Teil dieser Säuren mit Diazomethan verestert.

Methylester der weiter gereinigten Säuren.

Die Ätherlösung der aus dem mikrokristallinen Natriumsalz gewonnenen Säuren wurde direkt mit überschüssiger ätherischer Diazomethanlösung bei Zimmertemperatur versetzt. Es trat lebhafte Stickstoffentwicklung ein, die nach 5 Min. beendet war. Die vom überschüssigen Diazomethan noch gelb gefärbte Lösung wurde noch eine Viertelstunde stehen gelassen und dann auf ein Viertel ihres Volumens eingedampft. Beim langsamen Abkühlen kristallisierte nun der Ester in deutlich erkennbaren Blättchen aus. Noch besser und in großen klaren Blättchen kam der Methylester aus Methanol heraus. Der Schmelzpunkt dieses kristallisierenden Methylesters war jedoch sehr unscharf, er lag zwischen 95° und 110°, und blieb es auch nach mehrmaligem Umkristallisieren. Auch aus Äther und Alkohol konnte kein scharf schmelzender Methylester erhalten werden, obwohl das Kristallisationsvermögen außerordentlich gut war. Längeres Trocknen im Vakuum bei 75° änderte auch nichts am Schmelzpunkt. Ebenso führten Versuche, die Substanz fraktioniert zu kristallisieren, zu keiner einheitlichen Substanz mit scharfem Schmelzpunkt.

Aus den Säuren, die in Äther schwer löslich waren, die sich also zuerst aus dem Äther ausgeschieden hatten, waren keine alkohollöslichen und kristallisierenden Alkalisalze zu erhalten. Auch als freie Säuren konnten sie nicht weiter gereinigt werden.

Für weitere Trennungsversuche wurden erneut 100 g Ausgangsmaterial in der schon beschriebenen Weise aufgearbeitet, mit dem Unterschied, daß die in Äther gut löslichen Säuren, die hier von Interesse sind, nicht mit Natronlauge als Salze aus der Ätherlösung gefällt wurden, sondern die Ätherlösung wurde zur Trockne eingedampft, die Säuren in Alkohol gelöst und mit Natriumäthylat gegen Phenolphtalein neutralisiert. Die Natriumsalze schieden sich nun je nach ihrer Löslichkeit in drei Fraktionen aus, deren jede für sich wieder aus Alkohol umkristallisiert wurde. Die weißen Natriumsalze wurden — wie schon beschrieben — in die freie Säure und dann in den Methylester übergeführt. Alle drei Fraktionen hatten als Ester jedoch die gleichen Eigenschaften: klare Blättchen vom unscharfen Schmelzpunkt 95° bis 115°. In niedrigsiedendem Petroläther war der Methylester schwer, aber doch merklich löslich.

Es wurde versucht, ihn durch Extraktion mit Petroläther zu trennen. Die drei Fraktionen der Methylester, zusammen 1,1 g, wurden, aus Methanol umkristallisiert, vereinigt und 10 Stunden mit 30 ccm Petroläther aus der Hülse extrahiert. Das Meiste war in Lösung gegangen. Ein Teil hatte sich aus dem Petroläther wieder ausgeschieden, der Rest blieb gelöst. Diese drei Teile wurden getrennt weiterbehandelt.

1. Der vom Petroläther ungelöste Teil kristallisierte aus Methanol wieder in dünnen Lamellen, schmolz aber zwischen 110° und 130°, ebenso nach Kristallisieren aus Äther.
2. Ähnlich verhielt es sich mit dem in Petroläther schwerlöslichen Teil. Häufiges Umkristallisieren aus verschiedenen Lösungsmitteln brachte stets gut kristallisierende, aber im Schmelzpunkt gänzlich unscharfe Gemische. Zuerst F = 90°—120°, aus Äther 100°—135°. Aus der Mutterlauge davon eine Fraktion F = 90° bis 102°.

   Eine gewisse Trennung in höher und in niedriger schmelzende Körper war also möglich, aber aus keiner der Fraktionen konnte eine scharf schmelzende Substanz erhalten werden. Stets wurde ein vorzeitiges Sintern und dann ein allmähliches Zusammenschmelzen bis zur völligen Klärung der Schmelze beobachtet.
3. Die im Petroläther gelöst gebliebenen Methylester kristallisierten direkt aus diesem. Erste Fraktion F = 115°—145°, zweite Fraktion F = 100°—115°, dritte Fraktion F = 86°—93°. Dies waren nun schon sehr kleine Mengen, so daß nicht mehrmals umkristallisiert werden konnte. Die Schmelzpunkte wurden noch etwas höher, aber nicht mehr schärfer.

Versuche zur Trennung durch Adsorption.

Da auf den bisher beschrittenen Wegen keine einheitliche definierte Substanz erhalten werden konnte, wurde versucht, das Estergemisch nach der Methode der selektiven Adsorption an ein geeignetes Adsorptionsmittel, in diesem Falle standardisiertes Aluminiumoxyd nach Brockmann, zu trennen. Für die freien Säuren und die Natriumsalze fand sich kein geeignetes Adsorptionsmittel.

Vorversuche ergaben, daß die in Benzol leicht löslichen Methylester aus dieser Lösung gut adsorbiert wurden und sich durch Nachwaschen, „Entwickeln", mit viel Benzol in einer Säule von Aluminiumoxyd allmählich verteilen ließen.

400 mg zwischen 90° und 120° schmelzender kristallisierter Ester wurden in 25 ccm Benzol gelöst und im Verlaufe einer Viertelstunde durch eine 15 cm hohe und 1 cm dicke Säule von Aluminiumoxyd, die vorher mit Benzol durchfeuchtet worden war, gesaugt. Dann wurden bei schwachem Unterdruck noch 100 ccm Benzol durchgeleitet. Das überschüssige Lösungsmittel wurde abgesaugt und die Säule zu 8 gleichen Teilen aus dem Glasrohr herausgekratzt und getrennt weiterbehandelt.

Die untersten drei Zonen gaben keine Farbreaktion und wurden nicht weiter verarbeitet. Bei allen übrigen Zonen fiel die Farbreaktion positiv aus. Aus der 4. bis 6. Zone von unten ließen sich durch Extraktion mit Äther drei Fraktionen Methylester gewinnen, die sich in ihren Eigenschaften nicht voneinander unterschieden. Sie waren alle drei gut und einheitlich kristallisiert, rechteckige Blättchen, und schmolzen zwischen 90° und 105°. Die aus den beiden obersten Schichten extrahierte Substanz kristallisierte schlecht und war schmierig, stellte also die Verunreinigung des eingesetzten Materials dar. Trotz der Abtrennung derselben konnte also kein scharf schmelzendes Produkt erhalten werden. Zur Untersuchung, ob etwa Lösungsmittel eingeschlossen sei und so ein frühzeitiges Sintern verursache, wurde eine Probe im Hochvakuum bei 75° längere Zeit getrocknet. Es war zwar eine Gewichtsabnahme von 4—5% festzustellen, aber am Schmelzpunkt änderte sich nichts.

Die so erhaltenen gut kristallisierten Ester wurden wieder in niedrigsiedendem Petroläther gelöst und aus der durch Einengen übersättigten Lösung langsam stufenweise auskristallisiert; auch danach waren die Ester uneinheitlich.

Analyse des Methylesters.

Zur Bestimmung des Sauerstoffgehalts der fraglichen Methylester wurde eine Probe von zuletzt aus Petroläther kristallisiertem Ester vom Schmelzpunkt 90°—105° analysiert.

Einwage: 4,049 mg; CO_2 1,390 mg; H_2O 3,58 mg;
getrocknet bei 85° i. V. über Phosphorpentoxyd.

Gefunden:		C 76,9	H 9,91%
Berechnet für	$C_{25}H_{40}O_3$	77,26	10,38%
„	$C_{23}H_{36}O_3$	76,6	9,91%

Die Substanz enthält rund 13% Sauerstoff.

Bei Zugrundelegung der ungefähren Molekülgröße von Gallensäuren würden also im Molekül 3 Sauerstoffatome vorhanden sein. Die Kohlenstoffanzahl ist nach den Analysenzahlen nicht ganz sicher. Da es sich bei dem dritten Sauerstoffatom wahrscheinlich um eine OH-Gruppe handelt, wurde versucht, den Methylester in Pyridin zu benzoylieren, wie dies bei den Sterinen üblich ist. Aus dem Reaktionsprodukt konnte jedoch kein kristallisierter Körper erhalten werden.

Weitere Versuche zur Reindarstellung der gesuchten Säuren.

Es wurden erneut 150 g Ausgangsmaterial in der schon beschriebenen Weise auf Säuren verarbeitet. Bei der Reinigung der Natriumsalze durch Umkristallisieren aus Alkohol zeigte sich, daß diese aus 90,%igem Alkohol wesentlich besser kristallisierten als aus reinem Alkohol. Da die Versuche, die Säuren und deren Methylester in einheitlichem Zustand zu erhalten, bisher zu keinem einwandfreien Resultat geführt hatten, wurde versucht, durch eine möglichst weitgehende Reinigung der Natriumsalze zu besseren Präparaten zu gelangen.

Die Natriumsalze wurden nach ihrer Löslichkeit in 90-%igem Alkohol in drei Fraktionen geteilt und jede von diesen wieder mehrmals umkristallisiert. Die Na-Salze kamen alle in den gleichen, sehr feinen, mikrokristallinen langen Prismen heraus. Die drei Fraktionen lieferten auf Ester verarbeitet jede wieder das gleiche Gemisch. Die Farbreaktionen der drei Fraktionen waren auch die gleichen. Der Schmelzpunkt lag zwischen 90° und 120°.

Auch durch Hochvakuumdestillation konnte keine weitere Trennung der Ester erreicht werden. Die Hauptmenge ging bei 240° und 0,3 mm Hg über, ein kleiner Rest bei 250°—270°, der aber nicht mehr kristallisierte. Die in der Vorlage erstarrte Hauptmenge wurde nach dem Umkristallisieren aus Methanol in schönen Lamellen, aber mit dem gleichen unscharfen Schmelzpunkt erhalten. Der kristallisierte Methylester gab mit Tetranitromethan kräftige Gelbfärbung, was auch bei den übrigen erhaltenen Fraktionen der Ester der Fall war. Er ist also ungesättigt.

Bei dem Versuch, ihn in Eisessig mit reduziertem Platinoxyd als Katalysator zu hydrieren, wurde jedoch trotz mehrstündigen Schüttelns kein Wasserstoff aufgenommen.

Trennungsversuch nach der Methode der chromatographischen Adsorption.

Der oben beschriebene Versuch einer Trennung des Estergemisches auf Grund der verschieden starken Adsorption an Aluminiumoxyd aus Benzollösung hatte den Nachteil, daß die Säule ohne Kenntnis der Verteilung und Lage der Substanz in mehrere willkürliche Teilstücke zerlegt werden mußte, weil eine Analysenquarzlampe zur eventuellen Sichtbarmachung der farblosen Substanz im Adsorptionsrohr nicht zur Verfügung stand. Als nun dazu neuerdings die Möglichkeit bestand, wurde der Versuch wiederholt, und es zeigte sich, daß die Substanz in einem Adsorptionsrohr aus Uviolglas bei der Bestrahlung in der Analysenquarzlampe wenigstens zum Teil an ihrer Fluoreszenz erkennbar war.

240 mg Methylester vom Schmelzpunkt 90°—120° wurden in Benzol gelöst und langsam durch eine Säule von Aluminiumoxyd nach Brockmann von 15 cm Höhe und 1,5 cm Dicke geleitet. Dann wurde im Verlauf 1 Stunde mit 100 ccm Benzol entwickelt. Im Lichte der Analysenlampe zeigte sich nun folgendes Bild: Zu oberst befand sich eine stark grün fluoreszierende dünne Schicht, die folgenden 5 cm hatten keine Fluoreszenz; dann war eine ca. 1 cm hohe Schicht von hell violetter Fluoreszenz zu sehen. Der darunter befindliche Teil fluoreszierte nicht. Die Trennungsflächen der Schichten wurden unter der Lampe angezeichnet und dann die einzelnen Schichten getrennt herausgekratzt und weiterbehandelt. Der Teil der Säule, der unter der violettfluoreszierenden Schicht lag, enthielt keine Substanz mehr, wie die Prüfung durch die Liebermann-Burchard'sche Farbreaktion ergab. Die Farbreaktion aller drei oberen Schichten war die gleiche. Im Filtrat befand sich keine gelöste Substanz.

Die drei oberen Schichten wurden mit Äther extrahiert.

1. Die oberste dünne Schicht enthielt nur geringe Mengen nicht kristallisierender Verunreinigungen.
2. Der Ätherextrakt der nicht fluoreszierenden Zwischenschicht schied nach dem Einengen auf 3 ccm schön kristallisierte Blättchen vom Schmelzpunkt 100°—105° aus. Umkristallisieren aus Äther oder Methanol erhöhte zwar den Schmelzpunkt bis auf 110°, wobei er aber zugleich unschärfer wurde (100°—110°).
3. Die aus der violettfluoreszierenden Schicht erhaltenen Methylester kristillasierten ebenso, schmolzen aber zwischen 120° und 145°. Umkristallisieren brachte keine Änderung.

Die Hauptmenge war in der mittleren Schicht enthalten.

Da mit Hilfe dieser Methode wenigstens eine gewisse Trennung erfolgt war, wurden die zwischen 100° und 110° schmelzenden Teile der Ester vereinigt nochmals der gleichen Adsorptionstrennung unterworfen. Es war diesmal wieder eine zwar schwächere schmale Schicht von violetter Fluoreszenz zu sehen. Nach der Extraktion hatte der Ester der mittleren, nicht fluoreszierenden Schicht aber wieder denselben unscharfen Schmelzpunkt. In der unteren Schicht waren nur Spuren enthalten.

Durch mehrfaches Umkristallisieren aus Methanol erhöhte sich der Schmelzpunkt des Esters auf 106°—112°, wurde aber nicht schärfer.

Da von einer um 100° schmelzenden Fraktion der Methylester bereits eine Analyse vorliegt, wurde diesmal eine solche von dem höher schmelzenden Ester 120°—145° vorgenommen. Die Probe wurde bei 100° im Vakuum über P_2O_5 getrocknet. Gewichtsabnahme 0,158 mg; Einwage 4,117 mg; CO_2 11,700 mg; H_2O 3,92 mg.

Gefunden:		C 77,51	H 10,65 %
Berechnet für	$C_{25}H_{40}O_3$	77,26	10,38 %
„ „	$C_{26}H_{42}O_3$	77,55	10,51 %

Da über die freien Säuren und die Methylester zu keinem einwandfrei definierten Körper zu gelangen war, wurde noch einmal versucht, nach Aufarbeitung neuen Ausgangsmaterials durch möglichst weitgehende Reinigung des Natriumsalzes zu einem einheitlichen Präparat zu kommen.

Von 150 g Ausgangsmaterial blieben nach dreimaligem Ausschütteln mit Sodalösung und Wiederaufnahmen in Äther nach dem Abdampfen desselben 8 g Rohsäuren als gelbe harzige Masse. Diese wurde in Alkohol aufgenommen und mit alkoholischer Natronlauge neutralisiert. Der am schwersten lösliche Teil der Natriumsalze kristallisierte nicht und wurde abgetrennt. Die Hauptmenge kristallisierte mit 90-%igem Alkohol in mikrokristallinen flachen bis nadelförmigen Prismen, sah aber nicht ganz einheitlich aus. Vollkommen einheitliche verfilzte feine Nadeln wurden erhalten, wenn man die weißen kristallinen Natriumsalze in 95-%igem Pyridin heiß löste und sehr langsam abkühlen ließ. Diese Operation wurde wiederholt, und aus dem so gewonnenen Salz die Säure in Freiheit gesetzt.

Die Säure kristallisierte nicht mit Äther. Aus Methanol, in dem sie sehr leicht löslich ist, kam sie in Büscheln von spitzen Blättchen heraus. Sie schmolz auch nach zweimaligem Umkristallisieren unscharf

zwischen 165° und 185° unter leichter Braunfärbung. Sie ist schwach hygroskopisch.

Titration der Säure.

Eine Probe dieser Säure wurde in alkoholischer Lösung mit n/10 Natronlauge gegen Phenolphtalein titriert.
0,0503 g Säure verbrauchten 1,20 ccm 0,0982 n.Natronlauge.

$$\text{Äquivalentgewicht} = \frac{0{,}0503 \cdot 1000}{1{,}2 \cdot 0{,}0982} = 427$$

Wenn auch diese Bestimmung nicht sehr genau sein mag, so zeigt sie doch, daß die fraglichen Säuren sich in der Größenordnung der Gallensäuren bewegen.

Analyse der Säure: Die Säure wurde bei 100° im Vakuum über P_2O_5 getrocknet. Einwage: 4,144 mg; CO_2 11,510 mg; H_2O 3,87 mg.

Gefunden:	C 75,75	H 10,45 %
Berechnet für $C_{24}H_{40}O_3$	76,53	10,71 %
Berechnet für $C_{22}H_{36}O_3$	75,86	10,35 %

Der Methylester dieser kristallisierten Säure schmolz wieder unscharf zwischen 110° und 120°. Trennungsversuche mit der chromatographischen Adsorption waren auch jetzt ohne endgültigen Erfolg.

Lebenslauf.

Am 22. März 1908 wurde ich, Hermann Schreiber, zu Ingelheim a. Rh. als Sohn des Dr. ing. Hermann Schreiber geboren. Dort besuchte ich 3 Jahre die Volksschule und 5 Jahre die Höhere Bürgerschule bis Obertertia, anschließend das Realgymnasium zu Mainz. Dieses verließ ich im Herbst 1924 und trat zum Heinrich Hertz-Realgymnasium zu Hamburg über, wo ich Ostern 1927 die Reifeprüfung ablegte. Dann begann ich an der Technischen Hochschule Hannover das Studium der Chemie. Nach 4 Semestern, Ostern 1929, setzte ich an der Universität München mein Studium fort und bestand hier am 8. November 1930 das erste und am 3. März 1933 das zweite Verbandsexamen. Hierauf begann ich mit der Ausführung meiner Doktorarbeit unter Leitung von Herrn Geheimrat Professor Dr. H. Wieland und beendete diese im Juli 1935.